FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

Année 1955

N° 389

Thèse pour le

Doctorat en Médecine

(Diplôme d'Etat)

par

Roger BESSON

Pharmacien,
Ancien Interne des Hopitaux de Paris,
Ancien Chef de Laboratoire à la Faculté de Médecine,
Chef de Laboratoire adjoint à l'Hôpital Beaujon,
Né le 2 Août 1920, à Paris.

Présentée et soutenue publiquement le 1955

TECHNIQUES BIOLOGIQUES DE DOSAGE DES OESTROGENES

Etude de différents procédés, Résultats personnels,

Intérêt clinique.

Président : Monsieur le Professeur Jean QUENU

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

Année 1955 N°

Thèse pour le

Doctorat en Médecine

(Diplôme d'Etat)

par

Roger B E S S O N

Pharmacien,
Ancien Interne des Hopitaux de Paris,
Ancien Chef de Laboratoire à la Faculté de Médecine,
Chef de Laboratoire adjoint à l'Hôpital Beaujon,
Né le 2 Août 1920, à Paris.

Présentée et soutenue publiquement le 1955

TECHNIQUES BIOLOGIQUES DE DOSAGE DES OESTROGENES

Etude de différents procédés, Résultats personnels,

Intérêt clinique.

Président : Monsieur le Professeur Jean Q U E N U

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

1 - 7 - 54

DOYEN HONORAIRE :
M. BEAUDOIN

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. BEAUDOIN, BRINDEAU, CADENAT, CARNOT, CHABROL, CHEVASSU, CHIRAY, CLERC, DELBET, GOUGEROT H., GUILLAIN, HARVIER, LAUBRY, LEMAITRE, LEMIERRE, LHERMITTE, LIAN, LOEPER, MARION, MATHIEU, MOCQUOT, MULON, OLIVIER E., OMBREDANNE, SANNIE, SEZARY, TANON.

DOYEN : ..... Léon BINET
Membre de l'Institut.

ASSESSEUR..... Jean VERNE

- I - PROFESSEURS

		MM.
Anatomie.....		CORDIER G.
Anatomie pathologique.....		DELARUE A.
Bactériologie.....		GASTINEL P.
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports.....		CHAILLEY-BERT P.
Biologie médicale.....		VERNE J.
Cancérologie médicale et sociale.....		HUGUENON R.
CARCINOLOGIE.....		OBERLING C.
Chimie médicale.....		N...,
Cliniques chirurgicales...	Hotel-Dieu...	BROCQ P.
	Broussais...	de GAUDART-d'ALLAINES F.
	Salpêtrière...	MONDOR H.
	Cochin.....	QUENU J.
Clinique chirurgicale réparatrice et orthopédique.....		MERLE d'AUBIGNE R.
Clinique de Cardiologie.....		DONZELOT E.
Clinique de Chirurgie infantile et d'Orthopédie.....		FEVRE M.
Clinique de Chirurgie Pleuro-pulmonaire.		MONOD R.
Clinique de la Tuberculose.....		BERNARD E.
Clinique de Neuro-Chirurgie.....		PETIT-DUTAILLIS D.
Clinique de Puériculture.....		LEBONG M.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.....		DEGOS R.
Clinique des maladies du sang.....		CHEVALLIER P.
Clinique des maladies du système nerveux		ALAJOUANINE T.
Clinique des maladies des enfants.....		DEBRE R.
Clinique des maladies infectieuses.....		MOLLARET P.
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale.....		DELAY J.
Clinique gynécologique.....		FUNCK-BRENTANO P.
Cliniques médicales.....	Hotel-Dieu...	BENARD H.
	Bichat.....	LAROCHE G.
	Cochin.....	MOREAU R.
	BROUSSAIS	de GENNES L.

MM.

Clinique médicale d'hydro-climatologie.... thérapeutique..... JUSTIN-BESANCON L.
Clinique médicale propédeutique..... PASTEUR VALLERY-RADOT
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition.. BOULIN R.
Cliniques obstétricales.... Tarnier..... LANTUEJOUL P.
Baudelocque... LEVY-SOLAL E.
Port-Royal.... LACOMME M.
Clinique ophtalmologique..... VELTER E.
Clinique oto-rhino-laryngologique..... AUBIN A.
Clinique physio-pathologique des problèmes alimentaires (chaire à titre personnel)..... RICHET C.
Clinique psychiatrique infantile..... HEUYER C.
Clinique rhumatologique et sociale..... COSTE F.
Clinique stomatologique..... DECHAUME M.
Clinique thérapeutique chirurgicale..... SENEQUE J.
Clinique thérapeutique médicale..... LEMAIRE A.
Clinique urologique ..... FEY B.
Embryologie..... GIROUD A.
Génétique..... LAMY M.
Histoire de la Médecine et de la Chirurgie MOUQUIN M.
Histologie..... CHAMPY C.
Hygiène et clinique de la première enfance CATHALA J.
Hygiène et Médecine préventive..... JOANNON C.
Médecine du travail..... DESOILLE H.
Médecine légale..... PIEDELIEVRE R.
Parasitologie et Histoire naturelle médicale..... GALLIARD H.
Pathologie chirurgicale..... MENEGAUX G.
Pathologie exotique..... LAVIER G.
Pathologie expérimentale et comparée..... LENEGRE J.
Pathologie humorale et immunologie expérimentale (Chaire à titre personnel)..... MERKLEN F.P.
Pathologie médicale..... BARIETY M.
Pathologie et thérapeutique générales..... GARCIN J.
Pédiatrie sociale..... MARIE F.
Pharmacologie et matière médicale..... HAZARD R.
Physico-chimie médicale (chaire à titre personnel)..... DOGNON A.
Physiologie..... BINET L.
Physique médicale..... STROHL A.
Radiologie médicale..... DESGREZ H.
Technique chirurgicale..... MOULONGUET P.
Thérapeutique..... TURPIN R.

II - PROFESSEURS SANS CHAIRE ,

MAITRES DE CONFERENCES-AGREGES ET AGREGES

MM.

Anatomie	DEBEYRE J. DELMAS A. (Pr. s. ch.)
Anatomie pathologique	N..., GAUTHIER-VILLARS (Mlle P. Pr. s. ch.) BUSSER F. GOUYGOU C.
Bactériologie	FASQUELLE R. NEVOT A.
Biologie médicale	BOURLIERE F.
Chimie médicale	ETTORI J. (Pr. s. ch.) JAYLE M.F. (Pr. s. ch.) SCHAPIRA G.
Dermato-Syphiligraphie	DUPERRAT F.
Histologie	BULLIARD (Pr. s. ch.) GOUJARD R. N...,
Hydrologie	DEBRAY C.
Hygiène	BOYER J. DEPARIS M.
Médecine légale et du travail	DEROBERT L. GAULTIER M. HADENGUE A.
Neurochirurgie	DAVID M.
Neurologie	de SEZE S.
Obstétrique	GRASSET J. LEPAGE F. MAYER M. MERGER R. MORIN P. RAVINA J. VARANGOT J.
Ophtalmologie	OFFRET G. DESVIGNES P.
Orthopédie	JUDET R.
Oto-rhino-laryngologie	HALPHEN E. (Pr. s. ch.) AUBRY M. MADURO R.
Parasitologie	BRUMPT L. CHABAUD A.

MM.

Pathologie chirurgicale.....	BOULKER P. BAUMANN J. GOSSET J. HUGUIER J. LAURENCE G. LEGER L LORTAT-JACOB J-L. OLIVIER Cl. PADOVANI P. POILLEUX P. ROUX M. RUDLER J-C. VERNE J-M.
Pathologie expérimentale.....	N...,
Pathologie médicale.....	BERNARD J. BOUDIN G. CASTAIGNE P. CONTE M. DECOURT J. DOMART A. DREYFUS Gilbert FAUVERT R. HAMBURGER J. KOURILSKY R. LAMOTTE M. LAROCHE C. MILLIEZ P. PEQUIGNOT H. PERRAULT M. RAMBERT P. THIEFFRY St. TURIAF J.
Pédiatrie.....	JOSEPH R. LAPLANE R. N...,
Pharmacologie.....	LEVY (Mlle J.)Pr.s.Ch. CHEYMOL J.H. Pr.s;ch.
Physiologie.....	BARGETON D. Pr.s.ch. PARROT J-L.
Physique médicale.....	DJOURNO A. Pr.s;ch. GOUGEROT L.
Pneumo-Phtysiologie.....	KREIS B.
Psychiatrie	BARUK H.
Psychiatre infantile	MICHAUX L.
Stomatologie.....	CERNEA P. CHAPUT A.(Mm)
Thérapeutique.....	PERRAULT chargé de l'enseignement
Urologie.....	KUSS R.

III - PROFESSEURS HONORAIRES et AGREGES RAPPELES A L'EXERCICE pour le service des examens

MM. BRINDEAU A. (Obstétrique), GATELLIER J. (Clinique chirurgicale)
LE LORIER V. (Obstétrique), VAUDESCAL R. (Obstétrique)

IV - PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGREGES CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE, à titre permanent.

	MM.
Clinique chirurgicale	AMELINE A. PATEL J. SICARD A.
Clinique médicale.....	BROUET G. CACHERA R. HAGUENAU M. Fr.s.ch. MARCHAL G. SOULIE E.
Clinique obstétricale.....	ECALLE G.
Clinique ophtalmologique.....	RENARD G.
Clinique urologique.....	COUVELAIRE R.

	MM.
Secrétaire général de la Faculté.....	MOREL J.
Secrétaire	Mlle CHAINTREUIL G.

Conservateur, chargé de la Direction.....	Docteur HAHN A.
Conservateur.....	Mlle GOICHON
Bibliothécaires.....	Mlles DUMAITRE P., LE NOIR G., METIN F., QUIEVREUX E.

Par délibération en date du 9 Décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A la mémoire de mon Grand-Père

A ma Grand-Mère

A mes Parents

A ma Femme

A mes enfants

A Monsieur le Professeur Jean Q U E N U

Professeur de Clinique Chirurgicale
à la Faculté de Médecine de Paris

Chirurgien de l'Hôpital Cochin

Membre de l'Académie de Médecine

Membre de l'Académie de Chirurgie

Officier de la Légion d'Honneur

qu'il veuille bien accepter l'expression de notre grande reconnaissance pour l'affectueuse bienveillance qu'il nous a témoignée au cours de nos études: nous agréant successivement dans son service puis dans son Laboratoire et nous faisant enfin l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

A Monsieur le Professeur René M O R E A U

Professeur de Clinique médicale
à la Faculté de Médecine de Paris

Médecin de l'Hôpital Cochin

Officier de la Légion d'Honneur

qui a bien voulu nous admettre à l'Institut de Biologie Clinique de l'Hôpital Cochin pour la poursuite de notre travail.

Hommage de profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur agrégé René F A U V E R T

Médecin des Hopitaux

Chef du Centre des isotopes de l'Hôpital Beaujon

qui a bien voulu nous honorer de sa confiance en nous associant à ses recherches de chimie biologique.

Hommage de sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur S I M O N N E T

Professeur de Physiologie à l'Ecole Nationale vétérinaire d'Alfort

Professeur à l'Institut Agronomique

Membre de l'Académie de Médecine

qui nous a dirigé au cours de ce travail, nous orientant spécialement vers l'étude de la technique adoptée

Hommage de toute notre reconnaissance

A Monsieur le Docteur Cl. B E C L E R E

Ancien Chef de Clinique Gynécologique à la Faculté de Médecine de Paris

qui nous a inspiré ce travail; il nous en a rendu l'exécution possible et n'a cessé de nous prodiguer ses conseils éclairés

Hommage de notre gratitude la plus sincère

A Monsieur le Docteur L A V E R G N E

Chef de Laboratoire à la Faculté de Médecine de Paris

qui nous a beaucoup aidé
et nous a généreusement fait bénéficier de sa grande expérience en biologie

Hommage de notre reconnaissance

A Madame le Docteur Raymonde W E I L L - H E U L O T

Médecin de l'Hôpital Léopold Bellan

qui a bien voulu s'interesser à ce travail
et nous a envoyé des malades.

Nous avons eu la bonne d'être admis à l'Institut de Biologie clinique de l'Hôpital Cochin; au sein d'une équipe de travailleurs placée sous la direction de Monsieur le Professeur MOREAU et de Monsieur le Professeur HARVIER, nous avons trouvé les conseils qui nous étaient nécéssaires et une aide de chaque instant.

Nous y avons aimé la rigueur du travail aussi bien que la cordialité de l'ambiance.

Nous voulons exprimer notre reconnaissance

à Monsieur P.M. de T R A V E R S E

Chef de Laboratoire à la Faculté de Médecine de Paris
Chef de Travaux à l'Institut d'Hydrologie
Chevalier de la Légion d'Honneur

son aide précieuse aussi bien lors de nos études que dans l'exercice de notre profession et de nos recherches, est à l'origine d'une amitié réciproqie.

à Madame D E P R A I T E R E

Assistant à l'Institut d'Hydrologie et de Climatologie

grâce à sa connaissance approfondie des techniques biologiques et à son dynamisme scientifique, elle a apporté à l'exécution de ce travail une contribution très importante.

Nous remerçions également Mademoiselle B E C H E R I O T

dont la collaboration technique nous a été très précieuse.

- I N T R O D U C T I O N -

Le dosage des oestrogènes peut être effectué par deux sortes de méthodes :

les méthodes chimiques par colorimètrie,
les méthodes biologiques.

les unes et les autres possèdent leurs avantages et leurs inconvénients.

Les méthodes colorimètriques ont pris une grande extension spécialement en vue de l'étude des grossesses pathologiques.

Les méthodes biologiques conservent néanmoins des indications importantes, particulièrement :

dans les troubles gynécologiques
et dans les troubles hormonaux des jeunes filles et des jeunes femmes règlées.

Il semble bien en effet que dans ces derniers cas où les doses étudiées sont plus faibles, les méthodes biologiques soient à l'heure actuelle plus commodes, d'où l'intéret de leur étude.

La méthode classique est celle d'ALLEN et DOISY : des rates sont injectées avec un extrait actif et les modifications cytologiques du frottis vaginal sont étudiées, il faut utiliser des animaux castrés dont la sensibilité a été déterminée.

Cette méthode exige donc un gros travail : il faut en particulier avoir à sa disposition un important élevage d'animaux.

Il était donc interessant d'étudier une méthode biologique utilisant une réaction plus simple. Nous nous sommes orientés en conséquence vers les techniques utilisant l'augmentation pondérale de l'utérus du rongeur impubère après injection d'oestrogènes (ASTWOOD, LAUSON, EVANS, DORFMAN)

Après un rappel des différentes techniques utilisées nous décrirons la méthode que nous avons employée avec les essais qui ont été effectués pour en vérifier la validité.

Nous donnerons ensuite les résultats que nous avons obtenus dans les dosages urinaires et sanguins.

- Première Partie -

- HISTORIQUE -

En 1917 STOCKARD et PAPANICOLAOU (1) montrent que chez le cobaye femelle le type des cellules desquamantes de l'épithélium vaginal, examinées sur frottis, est en corrélation avec la phase du cycle génital. Ces auteurs introduisent la technique du frottis vaginal; comme le dit P. ASCHHEIM (2), cette invention du prélèvement des cellules desquamées, le frottis, marque une ère nouvelle de l'endocrinologie sexuelle.

En 1922, LONG, EVANS, ALLEN, COURRIER (3,4,5) rapportent qu'une corrélation identique existe chez la souris et la rate. COURRIER découvre dans le liquide folliculaire, une substance déterminant l'apparition du rût (6,7); en même temps et indépendamment, en 1923 et 1924, ALLEN et DOISY donnent leur test de détection d'activité oestrogènique lequel a joué un rôle fondamental dans l'étude des oestrogènes. Ils établissent que la double ovariectomie chez la souris abolit le cycle génital et supprime les modifications cellulaires observées au niveau de l'épithélium vaginal (oestrus), l'autogreffe fait réapparaitre le cycle; si au lieu de greffer un ovaire à des souris ainsi castrées, on injecte par voie sous-cutanée du liquide folliculaire d'ovaire de truie, on voit réapparaitre au niveau du vagin un oestrus typique: comme chez l'animal intact il y a remplacement des leucocytes par des cellules épithéliales nucléées puis anucléées.

La preuve était ainsi fournie du mécanisme hormonal de l'apparition de l'oestrus.

En conséquence, l'apparition de l'oestrus chez la souris castrée constitue le test d'activité de toute substance administrée.

Dans ce même travail on trouve une technique de préparation d'extrait de liquide folliculaire agissant comme substitut de l'ovaire, capable notamment de provoquer la puberté précoce.

Cette hormone du liquide folliculaire n'est pas spécifique de chaque espèce animale puisqu'un extrait de liquide folliculaire de truie agit sur la souris et sur la rate.

En 1924 les mêmes auteurs (8) donnent une méthode d'extraction de l'hormone folliculaire: ils comparent les taux d'hormones trouvés dans des extraits ovariens, des extraits de placenta ou d'autres tissus avec ceux du liquide folliculaire; les chiffres très supérieurs trouvés dans ce liquide mettent en évidence l'importance du follicule dans le cycle sexuel.

En 1925 FRANK et LOEWE (9,10,11) démontrent la présence d'une hormone oestrogène dans le sang.

La technique de FRANK est exposée avec ses applications dans une suite d'articles parus entre 1926 et 1940 (12 à 19) :

- 40 ml. de sang sont reçus dans une boite de Pétri sur 30 gr. de sulfate de sodium anhydre - on agite avec une spatule, on déssèche. La poudre est extraite avec deux fois 100 ml. d'éther - le résidu d'évaporation de l'extrait éthéré est émulsionné dans 2 ml. d'eau et injecté en 3 fois à 4 heures d'intervalle à une souris castrée; on examine le frottis vaginal et on recherche l'apparition de cellules kératinisées.
- On pratique pour les malades soit un examen 4 jours avant les règles ou bien au 5ème, 15ème et 21ème jour du cycle.
- Le test peut être positif seulement au 21ème jour, c'est le cas normal.
- Si le test est positif au 5ème jour, 15ème et 21ème jour, il y a hyperoestrogènie.
- Si le test est négatif durant tout le cycle, il y a hypooestrogènie.
- Dans les cas de grossesse le test devient positif entre la 6ème et la 8ème semaine.
  Après la 12ème semaine ce test peut servir au diagnostic de mort du foetus; en effet l'hormone disparait du sang plusieurs semaines avant que l'utérus n'expulse le foetus; 33 cas de grossesses où l'avortement était suspecté ou attendu ont été étudiés avec ce test de même qu'avec le test de Friedmann dans dans les urines.
  - le test de Frank fut négatif seulement dans les cas de mort du foetus.
  - le test de Friedmann a été positif dans 10 cas à tort, en dépit de la mort du foetus.

En 1936, une modification est effectuée dans la technique : on met à l'autoclave le résidu lipidique repris au préalable par de l'huile d'olives.

En 1940, FRANK reprenant l'ensemble de ses études antérieures, conclut à l'utilité de ce test :

- dans les aménorrhées, les ménorrhagies - augmentation ou diminution du taux des oestrogènes.
- pour la détermination de la viabilité du foetus.
- il signale enfin la détermination du sexe dans les cas d'hermaphrodites.

En 1927, SMITH (20) met en évidence l'augmentation régulière dans le sang des oestrogènes au cours de la grossesse; il prépare un extrait : le sang est précipité par l'alcool, le

précipité est extrait à l'alcool puis à l'éther - on évapore les solvants, le résidu est injecté en suspension aqueuse à des souris adultes castrées.

- à la 6ème semaine de gestation il faut 50ml. de sang pour produire l'oestrus.
- au 6ème mois 5ml. de sang.
- avant le travail 2,5ml. de sang.

En 1928 KAHNT et DOISY (21) indiquent une technique standardisée pour le test de l'oestrus :

- ils prennent des rates sur lesquelles on pratique un frottis par jour pendant 15 jours - on utilise les animaux à cycles réguliers - on les castre - on fait à nouveau une série de frottis pendant 15 jours pour contrôler s'il ne reste pas de résidu ovarien fonctionnel.
- puis on titre la sensibilité des animaux :
  on leur injecte 3 fois à 4 heures d'intervalle 1,3 unités rates d'oestrogène, si le frottis est negatif les animaux sont rejetés - on garde seulement ceux qui ont réagi - une semaine après on injecte 0,7 unité : les animaux positifs sont rejetés, on garde cette fois les animaux qui n'ont pas réagi.
- l'unité rate est la dose pour laquelle 75 % des animaux injectés donnent une réponse positive au frottis.
- on essaye alors le produit à doser àvec plusieurs dilutions injectées à plusieurs animaux.

En 1927-1928 ASCHHEIM et ZONDEK (22,23) mettent en évidence le pouvoir oestrogène de l'urine de femme enceinte et de jument gravide; ce qui a permis d'isoler l'hormone cristallisée (24,25), d'en faire la synthèse et sur le plan industriel, de préparer par extraction des urines de grandes quantités de folliculine (auparavant on s'adressait en effet à l'extraction directe sur la glande).

On trouve à cette époque de nombreuses descriptions de tests dérivés de celui d'ALLEN et DOISY et utilisés notamment pour standardiser les préparations administrées en thérapeutique. Ainsi les produits glandulaires plus ou moins inactifs ont pu être remplacés.

Les conditions opératoires varient suivant :

- l'animal employé (rat ou souris)
- le nombre d'injections et l'intervalle les séparant.
- le moment où le frottis vaginal est pratiqué.

Citons les tests de BUTENANDT, de MARRIAN et PARKES, de THAYER et DOISY, d'ALLEN et DOISY et de CURTIS et DOISY ce dernier consistant à observer sur des rates impubères la dose suffisante pour obtenir l'ouverture du vagin; ce test a été

employé en France par DURUPT (26) spécialement à cause de l'objectivité de la réaction observée.

Ces tests ne fournissent pas les mêmes résultats avec une préparation donnée, la valeur de l'unité-rat ou souris différant suivant le mode opératoire employé.

En 1936, HAM et ROBSON utilisant de l'oestrone cristallisé ont étudié la quantité exprimée en gamma d'hormone donnant une réponse positive au frottis dans des conditions variées :

- chez le rat :

  1°- en injectant une solution huileuse en 4 fois :

  1 unité-rat = 3,3 gammas d'oestrone.

  2°- en injectant une solution alcoolique à 10 % en 4 fois :

  1 unité-rat = 2,5 gammas d'oestrone.

- chez la souris :
  en opérant de la même façon :

  1°- 1 unité-souris = 0,09 gamma d'oestrone.

  2°- 1 unité-souris = 0,25 gamma d'oestrone.

L'unité internationale étant 0,1 gamma d'oestrone, on voit donc que l'unité est sensiblement égale à l'unité souris. L'unité-rat valant de 10 à 36 unités-souris.

En 1951 B. ZONDEK et F. SULMAN (28) avec de l'oestriol cristallisé ont étudié la valeur de l'unité par rapport au gamma sur le rat et la souris castrées et impubères comme véhicule de l'eau ou de l'huile; ils trouvent les mêmes valeurs pour l'animal impubère ou castré; la solution huileuse est 10 fois plus active que la solution aqueuse; enfin le rat est sensiblement 10 fois moins sensible que la souris.

On voit donc la nécéssité d'avoir un standard international (E.DOISY 1933 - 29 -). On peut ainsi exprimer les résultats en unités Internationales - DURUPT, (26).

DOSAGES URINAIRES -

A partir de 1930, les travaux rapportant l'élimination urinaire des oestrogènes deviennent très nombreux.

Les SMITH (31) citent les travaux de FRANK et ceux de DOISY. Ils donnent les essais successifs pour mettre au point l'hydrolyse qui est nécessaire pour libérer les oestrogènes qui, dans les urines, sont en majorité sous forme conjuguée : glycuro-conjuguée et sulfo-conjuguée; ils terminent leur dosage par le test de l'oestrus suivant le mode opératoire de KAHNT et DOISY (21). Ils signalent l'augmentation régulière du taux d'oestrogènes urinaires au cours de la grossesse.

GUSTAVSON et ses collaborateurs (32,33,34) trouvent en étudiant l'élimination chez la femme règlée, deux maxima l'un au moment de l'intermenstrum, le second à la phase prémenstruelle (phase lutéale).

- ils opèrent une hydrolyse acide, puis une extraction chloroformique.

- ils expriment leurs résultats par rapport à un étalon, l'oestrone, en unités internationales; ils trouvent au maximum 900 U.I. / 24 h.

- sans hydrolyse , ils trouvent encore les deux sommets d'élimination mais avec des quantités moindres.

En 1938, les SMITH séparent chimiquement dans les urines l'oestrone et l'oestriol.

A cette époque on a isolé en effet les trois principaux oestrogènes.

Le plus actif biologiquement retrouvé en 1936 dans l'ovaire de truie (30), à partir de liquide folliculaire, est l'oestradiol; on admet que c'est la forme secrétée par l'ovaire; la molécule présente le squelette du cholestérol avec une fonction alcool secondaire en 17 et une fonction phénol en 3.

La folliculine ou oestrone la plus anciennement connue, isolée des urines en 1929, elle possède sur le même noyau une fonction phénol en 3 et une fonction cétone en 17.

Enfin, l'oestriol ou hydrate de folliculine extraite par MARRIAN en 1929 de l'urine de femme enceinte, la moins active biologiquement; elle forme avec l'oestrone les deux produits du catabolisme de l'oestradiol.

Comme propriétés chimiques, citons leur solubilité dans les solvants organiques, les corps gras, les solutions faiblement alcalines . Leur résistance au chauffage à 100° (stable à l'hydrolyse).

Ces corps, ainsi que leurs dérivés peuvent se doser en dehors des techniques biologiques par la réaction qu'ils donnent avec l'acide sulfurique (réaction de KOBER), soit par fluorescence.

grossesse à son début) ce qui incite les auteurs à les essais thérapeutiques oestradiol-progestérone.

En 1941, les SMITH remarquent que l'addition de poudre de zinc à l'urine durant l'hydrolyse acide (hydrogénation) donne des chiffres de pouvoir oestrogènique de 1,5 à 12 fois supérieurs à ceux obtenus avec l'hydrolyse habituelle en présence d'acide chlorhydrique en ébullition, ceci étant dû, en dehors de le réduction de l'oestrone à l'état d'oestradiol, à la réactivation de métabolites de l'oestrone.

FLUHMANN (41,42,43,44) à partir de 1934 remplace le test d'ALLEN et DOISY avec lecture du frottis vaginal, par l'étude des coupes de l'épithélium vaginal suivant la technique histologique courante. Le test devient alors 5 fois plus sensible environ, l'auteur peut ainsi étudier les quantités d'oestrogènes présentes dans le sérum au cours du cycle.

- ceci avec des souris adultes castrées depuis 6 à 7 jours; contrairement à la technique de FRANK, le sérum est injecté directement - on distingue 5 types de réponses d'intensité croissante d'après le nombre de cellules constituant l'épithélium vaginal; on apprécie de la sorte des doses de 3 à 4 unités souris pour 100 ml. de sang total.

- on obtient ainsi un sommet d'élimination au milieu du cycle et un autre à la phase lutéale ce qui donne un aspect identique à celui de l'élimination urinaire; rappelons que le test de FRANK ne donnait qu'une réponse positive 4 à 5 jours avant les règles.

- on a des réponses avec le sang des femmes castrées ou ménopausées.

SOULE (45) avec cette technique trouve une concentration d'hormone identique de part et d'autre de la barrière placentaire, il explique ainsi la crise pubertaire de la naissance.

Avec une méthode modifiée RAKOFF (46) étudie les taux d'oestrogènes dans le sérum de femme enceinte. Il trouve des résultats plus constants avec le sérum qu'avec les urines de 24h.

- dans le sérum il trouve une montée régulière du taux entre la 4ème et la 40ème semaine, de 500 à 5.000 unités souris par litre.

-l'auteur, contrairement à FRANK, pense que pour diagnostiquer la mort du foetus il vaut mieux doser les prolans à la place des oestrogènes.

En 1943, RAKOFF et ses collaborateurs (47) mettent en évidence en plus des oestrogènes libres, des oestrogènes liés dans le sérum aux protéines; cette fraction est estimée égale à la fraction libre, elle est libérable par hydrolyse acide durant 6 heures à deux reprises.

Nous citerons maintenant les méthodes utilisant l'augmentation pondérale de l'utérus après injection d'oestrogènes à des rates ou des souris impubères par voie parentérale.

En 1938, ASTWOOD (48) utilise des rates impubères, il pratique une seule injection sous-cutanée en solution huileuse; l'animal est sacrifié à la 6ème heure après l'injection; on dissèque l'utérus, on le sèche et le pèse à la balance de torsion; on rapporte au poids de l'animal; 0,1 gamma d'alpha oestradiol ou 0,2 gammas d'oestrone font augmenter le poids utérin de 60 % environ; on décèle au minimum 0,25 gamma d'oestrone.

- on injecte d'abord des solutions d'oestrone ou d'oestradiol, puis à des animaux identiques, on injecte les solutions à doser. Les résultats obtenus sont rapportés aux courbes d'étalonnage obtenues avec des solutions titrées.

Cette augmentation pondérale est dûe à un appel d'eau dans le muscle utérin (réaction d'hydratation)

En 1934, LAUSON et collaborateurs (49) donnent un test utilisant aussi la rate impubère :

- on injecte les oestrogènes en solution aqueuse, trois jours de suite [illegible] par jour. L'animal est sacrifié 18 heures après la derniere injection. 0,09 gamma d'oestrone font augmenter de 12 mg. environ le poids de l'utérus. Le rapport d'activité $\frac{\text{oestradiol}}{\text{oestrone}}$ est 3 .

- les auteurs démontrent que l'antagonisme avec les androgène ne gène pas le dosage des oestrogènes aux [illegible] où on les trouve réunis dans les extraits de liquide biologique(voir note).Ils rappelent que ces extraits doivent être débarrassés des gonadotrophines; celles-ci donnent en effet sur l'animal impubère une réaction utérine analogue à celle des oestrogènes, le mécanisme de la réaction étant différent avec relai ovarien.

En 1951, DORFMAN et collaborateurs (51) opèrent dans des conditions voisines du test d'[illegible] :

- solutions huileuses souris impubères, injections pendant trois jours, mais une fois par jour, ils donnent des exemples d'étalonnage d'animaux avec des solutions titrées des trois oestrogènes. Les réponses sont chiffrées en rapport utérin ainsi défini :

$\frac{\text{[illegible] de l'utérus en mg}}{\text{poids du corps en grammes}}$ x 100 dont la valeur est normalement 80 à 100, [illegible] augmenté par l'action des oestrogènes jusqu'à 400.

NOTE - Cette opinion nous a été confirmée par le Docteur ZIZINE

Les quantités minima que l'on peut déceler sont 0,04 gamma d'oestrone, moins de 0,02 gamma d'oestradiol et 2 gammas d'oestriol.

- pour les extraits urinaires, on recommande de prendre l'oestrone comme standard.

- on injecte la solution standard à deux dilutions différentes ainsi que la solution inconnue.

De nombreux renseignements sur les calculs d'erreur sont donnés.

On a étudié le mécanisme de cette réaction pondérale de l'utérus aux oestrogènes.

REYNOLDS en 1938 (52) : l'oestrone favorise la vasodilatation locale, le flux sanguin augmente et des contractions rythmiques apparaissent, ces facteurs contribuent à l'augmentation de poids.

HECHTER en 1940 et 1941 (53,54) remarque par l'administration intra-veineuse de trypan bleu que l'oestradiol augmente la perméabilité des capillaires utérins.

HECHTER, d'autre part, diminue par l'atropine l'action pondérale de l'oestrone.

En 1950, COLE (55) cite ASTWOOD :

- 6 à 10 heures après l'injection sous-cutanée d'oestrone l'eau totale augmente dans l'utérus : augmentation de l'espace intra-cellulaire et du volume des cellules.

- 18 à 34 heures après, l'eau totale augmente à nouveau après une chute temporaire; les nucléoprotéines augmentent et seront responsables de l'augmentation de la pression osmotique.

BORY (56) citant les travaux de COUJARD précise que le sympathique réagit le premier à l'indication hormonale, ajoutant ainsi un maillon supplémentaire dans la chaîne complexe de cette réaction biologique.

On a sensibilisé la méthode classique dérivée de celle d'ALLEN et DOISY, en utilisant à la place de l'injection sous-cutanée l'introduction intra-vaginale; on recherche de la même façon, l'apparition de l'oestrus sur les animaux castrés et étalonnés.

POWERS en 1929 (57) prépare des pessaires à la gélatine contenant les oestrogènes et ne trouve pas, par cette voie, une plus grande activité.

LYONS en 1936 (58) provoque lui aussi la corni-

fication de l'épithélium vaginal en introduisant dans le vagin un extrait urinaire.

YERBY en 1937 (59) cite l'échec de POWERS, affirme que sur des rates castrées adultes 1/12 de l'unité parentérale d'oestrone peut être détecté par administration intra-vaginale. Il étudie avec ce procédé l'excrétion des oestrogènes dans les urines chez la femme pendant le cycle et trouve deux sommets d'excrètion : l'un à l'ovulation, l'autre avant les règles.

ALBRIEUX en 1941 (60,61) introduit des comprimés de sang désséché dans le vagin des rates castrées.

EMMENS en 1941 (62) utilise des solutions dans le glycérol dilué, injecte 1/100 de ml. à des souris ovariectomisées et observe le pourcentage de réponses positives au frottis. Il compare la sensibilité de l'injection sous-cutanée avec celle de l'injection intra-vaginale.

- Il trouve que l'oestrone est 260 fois plus active par cette dernière voie, l'oestradiol 50 fois plus et l'oestriol 2.000 fois.

- D'autres molécules de formules voisines se comportent de façon inverse: elles sont moins actives par voie intra-vaginale que par voie parentérale; il les appelle des préoestrogènes, qui avant d'être actifs doivent au préalable être métabolisés.

En 1949, HARTMAN (63) utilise comme dans le test de CURTIS et DOISY l'ouverture du vagin de l'animal impubère mais il opère sur le cobaye et injecte le matériel à tester dans la région de l'orifice vaginal.

En 1950 LOYD (64) pense que la méthode n'est pas quantitative.

En 1950-51 BIGGERS (65) utilisant la technique d'EMMENS augmente encore l'activité de l'oestrone en l'administrant par voie intra-vaginale en solution dans l'albumine à 1%, il rappelle les travaux de SZEGO étudiant l'affinité de l'oestrone pour les albumines du plasma (voir page 12).

En 1952, SULMAN (66) avec ce test peut déceler :

- 0,0001 gamma d'oestrone
- 0,00005 gamma d'oestriol
- 0,000.005 gamma d'oestradiol

il préconise le test pour les dosages dans le sang et les liquides de kyste et décrit une seringue spéciale mise au point pour l'injection des animaux.

ROLE DU FOIE -

Il faut rappeler maintenant le rôle primordial du foie dans le métabolisme des oestrogènes :

- d'abord il inactive l'oestradiol, hormone secrêtée au niveau de l'ovaire (Doisy -24-) pour donner des métabolites moins actifs : oestrone, oestriol, corps oxydés (SMITH)

- et aussi inversement, il réactive ces molécules par combinaison avec les protéines (SZEGO).

TALBOT en 1936 (68) empoisonne par le tètrachlorure de carbone des rongeurs impubères - le taux des oestrogènes augmente alors notablement et provoque chez les femelles le développement précoce de l'utérus.

HELLER en 1940 (69) utilise le test pondéral d'activité récemment étudié (49) inactive l'alpha oestradiol par contact avec des coupes de foie.

En 1941, DINGEMANSE (70) injecte à des chiennes hystérectomisées de l'oestrone cristallisée et ne retrouve dans les urines que 15 à 20 % des quantités injectées.

En 1944, SCHILLER et PINCUS (71) retrouve les mêmes faits chez le rat mâle normal; il voit en outre qu'après hépatectomie partielle, 1/3 seulement de la dose injectée est métabolisée.

En 1945, SZEGO et ROBERTS (72) remarquent que les oestrogènes sont inactifs sur les animaux éviscérés.

En 1947 ces auteurs (73) observent sur la rate partiellement hépatectomisée, une diminution de la sensibilité utérine aux oestrogènes injectés (ils emploient le test d'ASTWOOD) en outre les réponses utérines augmentent au fur et à mesure de la régénération du tissu hépatique.

Ces auteurs étudient l'état des oestrogènes dans le plasma humain, ils trouvent qu'ils sont pour les 2/3 combinés à une protéine qui est une beta globuline fraction III - o de Cohn; c'est le foie qui élaborerait le complexe oestro-protéine.

Ils évaluent à environ 0,5 gamma d'alpha oestradiol % la quantité d'oestrogène trouvée dans le sang chez la femme.

Ces mêmes auteurs (74,75,76) décrivent une technique très complexe d'extraction des oestrogènes du plasma par l'acétone à froid : nombreuses opérations permettant d'isoler les divers oestrogènes, ils trouvent chez la femme enceinte au dernier trimestre de la grossesse entre 1.200 et 7.300 U.I.

d'oestrone par litre (ils emploient un test dérivé de celui d'ASTWOOD).

En 1947, B.ZONDEK et R. BLACK (77) étudient la clearance de l'oestrone chez des femmes enceintes atteintes d'hépatites infectieuses et chez des cirrhotiques.

Ils trouvent que la clearance n'est augmentée qu'au dernier stade de la maladie (stade où le foie perd aussi le pouvoir de synthétiser l'urée).Ils donnent à cette occasion la quantité d'oestrone qu'ils trouvent dans le sang des femmes enceintes par la méthode d'Allen et Doisy.

- 1 à 2 mois	100 à 200 U.I. d'oestrone par litre.
- 3 à 7 mois	200 à 1.600 U.I. d'oestrone par litre.
- 7 à 9 mois	1.600 à 3.000 U.I. d'oestrone par litre.

En 1951, RAKOFF (78) étudie l'élimination d'oestrogènes dans les maladies du foie et la gynécomastie; il trouve sur 17 cirrhoses, 12 cas d'augmentation des oestrogènes, la présence de gynécomastie n'étant pas en corrélation avec un taux élevé d'oestrogènes, sur 22 cas de gynécomastie, il a 9 cas d'hyperoestrogènie.

Il établit comme normal pour l'homme une limite supérieure à 125 unités d'oestrone par 24 heures. Il pensent que les cas de gynécomastie avec un taux hormonal normal peuvent s'expliquer par un taux hormonal élevé antérieurement, ayant provoqué l'apparition du phénomène,qui persiste ensuite malgré le retour à un taux normal.

En 1953, C.M. SZEGO (79) met à incuber de l'oestrone marqué au carbone 14, au contact avec des protéines sériques en présence de coupes de foie ou d'autres tissus et voit que seul le tissu hépatique provoque la liaison des protéines avec l'oestrone.

Les oestrogènes sont probablement liés aux protéines du sérum à l'état de glycuronidates, le foie catalyse la formation de ce complexe.

Il y aura donc intérêt à connaître l'état du foie du sujet avant de pouvoir interprèter un résultat de dosage d'oestrogènes.

CONCLUSION -

Peut-on explorer le fonctionnement ovarien en dosant les oestrogènes dans les urines par une méthode biologique ?

Le principe de cette exploration a été critiqué ; on ne doserait qu'une très faible partie du produit de la secrètion ovarienne (follicule et corps jaune) et d'ailleurs les quantité excrètées au niveau des urines sont sous la dépendance de l'inactivation plus ou moins grande au niveau du foie ainsi que de la perméabilité rénale. On a vu d'autre part que la plus part des auteurs comparent l'activité oestrogène des urines avec celle de l'oestrone choisie en général comme étalon; il semblerait préférable de doser les oestrogènes isolés au préalable par rapport à un étalon identique au corps dosé.

En effet, en 1951, HUMM, MANSON et SALTER (80) ont dosé comparativement avec la méthode biologique et avec la méthode chimique des extraits préparés à partir d'urine de provenances diverses : femmes règlées, homme normal ou cas de gynécomastie (Réaction de KOBER et test de MARRIAN et PARKES). Le rapport des résultats obtenus avec les deux méthodes varie suivant la provenance des échantillons.

Rappelons aussi les travaux des SMITH qui trouvent en dosant les oestrogènes après isolement, une augmentation de l'oestriol au cours de la phase lutéale du cycle génital ainsi qu'une augmentation de l'oestradiol dans les urines à partir du 5ème mois de la grossesse.

En dehors des variations purement quantitatives on sera donc en présence de variations dans les proportions relatives entre les différents oestrogènes.

Ces faits enlèvent de la rigueur au principe du dosage global de produits d'activité différente; ils augmentent encore les difficultés déjà rencontrées dans les dosages de produits à l'état pur.

On aura donc finalement plutôt qu'une mesure rigoureuse, un test d'activité oestrogène; la valeur des résultats sera appréciée par leur corrélation avec les signes cliniques ainsi que par les résultats de la thérapeutique.

Malgré ces difficultés, on a pu voir d'après l'historique que les auteurs sont d'accord sur un certain nombre de faits :

- les oestrogènes présents dans les urines y sont conjugués à l'acide sulfurique ou glycuronique; il faudra donc commencer le dosage par une hydrolyse acide des urines dont l'activité oestrogène sera ainsi augmentée de façon notable.

- chez la femme, au cours du cycle génital, on trouve des variations notables de taux d'élimination urinaire avec deux maxima dont l'un correspond à l'ovulation (secrètion folliculaire) et l'autre, le plus souvent plus net, durant la phase lutéale : témoin de la secrètion d'oestrogènes par le corps jaune. Malgré des variations entre les chiffres dues aux techniques variées selon les auteurs, les résultats moyens pour les maxima se situent entre 200 et 500 U.I. (exprimées en oestrone) dans les urines de 24 heures.

Il faudra donc prélever les urines (si possible 2 à 3 jours de suite pour éliminer les variations journalières) à un moment du cycle bien choisi - en s'aidant au besoin de la température rectale matinale et en faisant dans les aménorrhées deux dosages à une dizaine de jours d'intervalle.

- dans la grossesse on a une augmentation d'abord faible jusqu'au 5ème mois (de 400 à 2.000 U.I.) puis une augmentation plus nette pouvant atteindre 20.000 à 80.000 unités avec des taux très variables selon les cas.

Les principales indications sont :

- l'étude endocrinnienne des troubles génitaux.

- l'étude des grossesses pathologiques.

- enfin certaines affections comme les ovarites scléro-kystiques, les tumeurs de l'ovaire : en effet une augmentation importante des oestrogènes chez une femme ménopausée, se voit dans les tumeurs de l'ovaire et de la surrénale.

- étude des liquides de kystes para-utérins (84) NETTER et HENRY séparent par le dosage biologique les liquides d'hydrosalpynx (moins de 190 gammas par litre), les liquides d'ovarite scléro-kystique (plus de 200 gammas par litre).

- chez l'homme enfin, l'étude des cas de gynécomastie ; étude possible plus facilement que chez la femme, des insuffisances d'inactivation hépatique.

- étude des cas de cancer du testicule.

A propos de l'interêt des dosages d'oestrogènes dans les cas de cancer, rappelons à titre d'exemple, deux observations :

- l'une de PALMER en 1939 (81) chez une femme ayant une tumeur de l'ovaire avec augmentation marquée du taux des oestrogènes urinaires, l'ablation de la tumeur ramène le taux à la normale.

r l'autre, plus récente (82) d'OSTERGAARD pour un cas de gynécomastie développée en deux ans - avec tumeur du testicule - le taux des oestrogènes urinaires monté à 200 unités-souris, l'ablation de la tumeur fait baisser le dosage à 50 unités-souris.

Comment, en pratique, ces dosages sont-ils réalisés ?

Rappelons les travaux réalisés par le Professeur SIMONNET et le Docteur BECLERE. Dans une série de publications, les auteurs ont étudié les troubles endocrinniens en gynécologie (86 à 94) :

- avec d'une part l'examen clinique organo-hormonal notant soigneusement l'âge de la puberté et le degré de développement de l'appareil génital, seins, vulve, système pileux, caractères des menstruations.

- avec d'autre part les dosages urinaires de l'hormone gonadotrope hypophysaire, de la folliculine et du pregnandiol.

En particulier, le dosage de la folliculine a été réalisé sur des rates castrées suivant la méthode générale classique déjà exposée : on détermine les doses d'extraits urinaires susceptibles de faire apparaitre l'oestrus artificiel. Deux essais successifs sont pratiqués avec des dilutions d'urine différentes de façon à avoir deux réponses - l'une négative, l'autre positive pour des chiffres assez voisins -(par exemple : réponse positive à 100 U.I. et négative à 200 U.I.) c'est donc une méthode par encadrement.

Les auteurs ont trouvé une corrélation entre les examens cliniques et les dosages urinaires; ils ont pu en tirer des conclusions efficaces au point de vue thérapeutique.

Ils établissent en particulier une classification des aménorrhées :

- les aménorrhées hypohormonales avec insuffisance globale pour les trois dosages.

- les aménorrhées hyperhormonales avec chiffres élevés,en particulier pour l'hormone gonadotrope et la folliculine.

Pour les dosages de folliculine qui nous interessent plus spécialement :

- les chiffres obtenus inférieurs à 150 U.I. ont été trouvés:

1°- après la ménopause,

2°- dans les aménorrhées des jeunes filles et des jeunes femmes, primitives ou secondaires.

- les chiffres moyens se situent entre 200 et 400 U.I.

- les chiffres élevés, au-delà de 500 U.I. se trouvent :

1°- dans les aménorrhées hyperhormonales des jeunes

filles et des jeunes femmes,

2°- dans les aménorrhées hyperhormonales préménopausiques.

3°- dans les hémorragies des jeunes filles et des jeunes femmes, d'origine congénitales.

4°- dans les hémorragies préménopausiques.

Pour souligner la valeur de ces dosages, il est bon de rappeler les faits suivants :

1°- au cours de l'hydrolyse acide des urines, les oestrogènes conjugués sont libérés et deviennent actifs biologiquement.

2°- les résultats sont comparables entre eux :

- les différents stades du dosage sont en effet effectués toujours dans les mêmes conditions.

- et surtout les animaux sont standardisés souvent en contrôlant leur sensibilité par l'injection d'une dose déterminée d'oestrone.

3°- on compare l'activité oestrogènique globale d'un mélange en proportions variables des différents oestrogènes présents dans les urines avec l'activité d'une solution titrée d'oestrone; on appréciera ainsi le pouvoir oestrogènique global des urines.

4°- on considère habituellement que dans ces dosages biologiques l'erreur relative est d'environ 50 U.I., en pratique on ne tient compte que des variations d'au moins 100 U.I.

Chez les femmes enceintes,les variations pathologiques sont considérables par rapport aux chiffres normaux; s'étageant en effet de moins de 50 à 2.000 U.I. et l'erreur relative devient négligeable dans ces conditions.

5°- la concordance avec les faits cliniques et les résultats thérapeutiques ont confirmé la valeur des chiffres obtenus avec ces méthodes depuis plus de 10 ans.

Citons encore à titre d'exemple : récemment BONDONNY, CASTET et collaborateurs (83) ont effectué des dosages d'oestrogènes par voie biologique sur la rate castrée avec le test classique d'ALLEN et DOISY; ils trouvent comme chiffres moyens 100 à 500 U.I. avec une approximative qu'ils évaluent à 50 U.I.

Au cours du cycle génital sur 31 femmes, 13 ont un sommet d'élimination au 15ème jour, 12 au 21ème jour, enfin 6 ont un sommet au 15ème et au 21ème jour.

Ils ont trouvé des cas d'aménorrhées hypofolliculiniques et hyperfolliculiniques; dans ces derniers cas, ils signalent la difficulté de déterminer la cause exacte de ces taux élevés : hypersecrètion de l'ovaire ou insuffisance d'inactivation au niveau du foie.

RIXE (85) dans une thèse récente en 1952, étudie par la méthode biologique les variations des taux d'oestrogènes au moment du travail.

Bien que sortant du cadre de ce travail, nous citerons les travaux si importants qui ont pu être effectués avec les méthodes de dosage par voie chimique : le Professeur JAYLE (97,98) pratique sur l'extrait phénolique urinaire une double mesure photomètrique de la réaction de KOIER. Il exprime les résultats en gamma de phénolstéroïdes pour la première lecture et en gamma de folliculine pour la seconde,plus spécifique.

Il a donné des résultats statistiques basés sur 392 déterminations pratiquées au cours de grossesses normales et plus de 2.000 sur des grossesses pathologiques. Il a pu ainsi déterminer le normogramme d'élimination; il étudie les déficits plus ou moins importants en folliculine et en stéroïdes neutres dans les grossesses pathologiques; il pose l'indication du traitement aux oestrogènes et porte un pronostic sur les chances d'accouchement normal.

" Le dosage de la folliculine en routine clinique nécés-
" site un outillage très perfectionné, en particulier des
" extracteurs semi-automatiques pour éliminer les erreurs
" dues aux facteurs individuels. Il doit être fait par des
" personnes sélectionnées et très entrainées."

Cette méthode d'exploration est donc l'apanage d'instituts spécialisés "il faut se méfier des analyses isolées", elle permet d'effectuer pour la même malade des dosages en série dans les meilleurs conditions.

C'est la méthode de choix pour suivre l'évolution d'une grossesse.

On ne pourra pas comparer les résultats obtenus avec les méthodes chimiques et biologiques :

- en effet, les trois oestrogènes naturels ont un pouvoir chromogène assez voisin (de 1 à 1,6 par exemple) - (en même temps des impuretés peuvent donner des réactions colorées identiques mais moins intenses).

- d'autre part, leur activité biologique est très différente (de 1 à 10 ou 20 suivant les techniques).

Ces faits expliquent que les chiffres donnés par les deux méthodes diffèrent sensiblement au cours de la grossesse.

En conclusion, il semble que l'on puisse affirmer à l'heure actuelle :

- en pathologie obstétricale où l'on est en présence de fortes doses d'oestrogènes, les méthodes chimiques sont les plus commodes.

- en pathologie gynécologique, en dehors de la grossesse, où l'on étudiera des doses beaucoup plus faibles les méthodes biologiques semblent jusqu'à présent les plus sensibles.

- Deuxième Partie -

- ETUDE EXPERIMENTALE DE LA METHODE UTILISEE -

Nous avons été orientés vers une méthode utilisant la variation pondérale de l'utérus, en laissant de côté la réaction basée sur une hydratation précoce de l'organe (lecture à la 6ème heure, test d'ASTWOOD), pour choisir une réaction tardive mais donnant des réponses plus importantes et basées sur le développement tissulaire 72 heures après l'injection (LAUSON, 1938 - EVANS, 1941 et enfin DORFMAN, 1951).

Comme dans le test de CURTIS et DOISY, nous utilisons des animaux impubères sans castration ni étalonnage préalable.

L'accroissement du poids utérin étant environ proportionnel au logarithme de la dose injectée, dans un intervalle de 0,06 gamma à 0,30 gamma d'oestrone, il est en général possible en injectant une seule dilution, d'obtenir des animaux une réponse significative.

Il faut obtenir de l'éleveur des animaux bien portants pesant entre 7 et 9 grammes, entre le 21ème et le 25ème jour. L'emploi d'animaux de poids sensiblement égaux étant très recommandable.

D'autre part, ces animaux sont aussi utilisés pour le dosage des gonadotrophines qu'il est souvent utile de pratiquer avec celui des oestrogènes. Il sera donc commode d'avoir à utiliser le même genre d'animal dans les deux cas.

STANDARDISATION DES ANIMAUX AVEC UNE SOLUTION TITREE D'OESTRONE -

Nous préparons la solution titrée à 10 mg. % dans l'alcool à 95° (1ml. contenant 100 gammas d'oestrone). Nous pesons pour cela 20 mg. d'oestrone et nous diluons dans une fiole jaugée de 200 ml. avec de l'alcool; la solution se fait lentement et demande 24 heures, elle se conserve bien à la glacière.

Avant l'injection, nous diluons au 1/100 dans

l'alcool la solution mère.(1 ml. contenant 1 gamma d'oestrone).

Nous préparons ensuite les quatre solutions huileuses injectables en mesurant dans quatre petits ballons 1 ml., 1,5 ml., 2,5ml., et 5 ml. de solution diluée (1 ml.= 1 gamma).

Nous évaporons à sec l'alcool au bain-marie; l'extrait est repris par quelques gouttes d'éther, nous ajoutons alors 5ml. d'huile d'arachide dans chaque ballon, et nous chauffons légèrement, pour faciliter la dissolution et chasser l'éther, en agitant soigneusement . Les quatre dilutions contiendront respectivement pour 0,3 ml. (volume injecté à chaque animal); 0,06 gamma, 0,09 gamma, 0,15 gamma et 0,30 gamma d'oestrone.

Avec chaque solution, cinq à six souris sont injectées à l'aide d'une seringue à insuline munie d'une aiguille type intra-dermo réaction.

Trois jours de suite nous injectons par voie dorsale sous-cutanée 0,1 ml. de solution huileuse. Après l'injection nous pinçons la peau quelques instants à l'endroit de la piqure pour éviter les pertes d'huile.

24 heures après la dernière injection, l'animal est sacrifié par inhalation de vapeur de chloroforme et pesé au 1/2 gramme près.

Puis nous disséquons soigneusement les cornes utérines et le corps utérin en excluant l'oviducte; nous le pesons ensuite rapidement à la balance de torsion à 1/2 mgr. près.

Nous disséquons de même les témoins non injectés.

Nous calculons ensuite le rapport utérin moyen sur l'ensemble des animaux de chaque groupe.

Pour chaque essai il faut prendre 5 ou 6 animaux . On élimine ainsi, dans une certaine mesure, les variations dues à des différences de sensibilité individuelle; des réponses voisines avec des animaux identiques sont obtenues le plus souvent, elles sont le témoin d'une réaction satisfaisante.

Pour les faibles doses, l'utérus ressemble à celui des animaux témoins : seule est appréciable une augmentation de poids.

Pour les doses fortes au contraire, l'organe est d'aspect congestif; il est augmenté de volume de façon variable; l'artère utérine est nettement visible, il faut la disséquer soigneusement.

NOTE - Nous remerçions vivement les Laboratoires ROUSSEL qui nous ont procuré des ampoules d'oestrone.

Si,

P = poids du corps en grammes.

U = poids de l'utérus en milligrammes.

on aura le rapport utérin : $\frac{U}{P} \times 100$

Voici les résultats que nous avons obtenus dans un essai de ce genre :

	ANIMAUX TEMOINS		DOSES D'OESTRONE INJECTEES							
			0,06gamma		0,09gamma		0,15gamma		0,30gamma	
	P,g.	Umg	P,g	U,mg	P,g	U;mg	P,g	U,mg	P,g	U,mg
	6,5	6	7	10	8	17	8=	17	7	29
	7,0	7	6	8	7	12	7	16	6	23
	7,0	6	8	8	7	15	7	15	6	16
	8,0	6	8	9	8	14	7	17	5	20
	8,0	7			8	11	7	15	5	20
	6,5	6			7,5	12	6	13		
	7,0	7			7	11	9	17		
	7,0	5			8	13	6	12		
	7,0	5			6	10	6	11		
	7,0	5			8	13	6	11		
	8,0	5			6	14	6	17		
					6,5	13				
					6	10				
					7	14				
					8	17				
					8	10				
Rapport utérin	82		120		178		210		373	

Il est donc possible entre les deux limites de 0,06 et 0,30 gamma d'établir une relation entre la dose et la réponse utérine proprement dite.

Nous mesurons le rapport utérin des animaux injectés avec la solution inconnue et nous nous reportons à l'essai de standardisation pour connaitre la dose correspondante en oestrone.

D'après le tableau d'étalonnage on pourra établir une courbe standard qui permettra de trouver les doses correspondant aux réponses utérines.

PREPARATION DE L'EXTRAIT URINAIRE -

Les difficultés pour obtenir la totalité des urines de 24 heures sont bien connue - les malades ont souvent beaucoup de mal à comprendre les consignes données -

Il est donc prudent de contrôler la diurèse moyenne par des dosages de créatinine et des mesures de densité urinaire.

Rappelons qu'on ne peut injecter les urines directement car il faut auparavant faire une hydrolyse qui augmente le pouvoir oestrogène notablement et détruit les gonadotrophines, puis on extrait les urines hydrolysées à l'éther, ce qui permet de faire commodement une solution huileuse concentrée.

Pour la préparation de l'extrait, on peut s'adresser à l'une des techniques proposées pour l'extraction des oestrogènes.

Nous avons utilisé la technique de JAYLE (96) :

- hydrolyse au bain-marie bouillant sous réfrigérant à reflux, 15°, en présence de 15 % de ClH pur et 12 % d'acide phosphotungstique à 10 %.
- refroidissement rapide à la glacière pendant au moins 1 h.
- filtration,
- épuisement par 300 cm3 d'éther (voir note)
- lavage de l'extrait éthéré 2 fois avec 150 cm3 de carbonate de sodium à 10 %, 2 fois avec 150 cm3 d'eau distillée.

L'extrait éthéré est désséché par contact avec du carbonate de potassium sec (environ 30 grs.). Après filtration l'éther est chassé par distillation au bain-marie à 50°C. et la déssication complètée par passage d'un courant d'air.

Il serait évidemment possible en faisant une première extraction avant l'hydrolyse, de doser les oestrogènes libres et les oestrogènes conjugués.

Nous avons vu en effectuent un étalonnage des animaux, qu'entre les deux limites de 0,06 gamma et 0,30 gamma d'oestrone on peut établir une relation entre les doses injectées à l'animal et la réponse utérine.

NOTE - L'épuisement est pratiqué dans un extracteur spécialement réalisé : allonge en verre avec robinet inférieur. Au Laboratoire du Professeur JAYLE ces opérations se font maintenant automatiquement.

Le problème pratique posé par le dosage consiste donc à concentrer dans le volume d'extrait injecté une quantité d'oestrogènes dont l'activité sera comprise entre ces limites.

En dehors des cas de grossesse les chiffres trouvés dans les urines sont situés, nous l'avons vu, entre 0 et 1.000 U.I. pour la plus part des cas.

On peut apprécier en une seule injection les doses comprises dans le rapport de 1 à 5; en explorant une zone comprise entre 100 et 500 U.I., on aura toute chance, pour les cas normaux, d'avoir un résultat compris entre ces limites.

DILUTIONS A PRATIQUER A PARTIR DE L'EXTRAIT URINAIRE -

L'extraction est conçue pour opérer sur 100 ml. d'urine; si l'extrait est repris par 20 ml. d'huile d'arachide on aura une solution 5 fois plus concentrée que l'urine. Comme chaque animal reçoit en tout 0,3 ml. d'huile, on mesurera donc l'activité oestrogène de 1,5 ml. d'urine. Si l'utérus donne la même réponse qu'avec 0,06 gamma d'oestrone, le pouvoir oestrogène d'un litre d'urine sera :

$$\frac{0{,}06 \text{ gamma} \times 1.000}{1{,}5} = 40 \text{ gammas } 0/00 \text{ ou } 400 \text{ U.I.}$$

si la réponse est de 0,30 gamma, un calcul identique donnerait 2.000 U.I., on explore donc de cette façon de 400 à 2.000 U.I. pour 0/00.

si l'extrait de 100 ml. d'urine est repris par 10 ml. on explorera alors entre 200 et 1.000 U.I. 0/00.

enfin, avec 5 ml. d'huile et 2,5 ml. la correspondance sera respectivement de 100 à 500 U.I. et 50 à 250 U.I.

Pour les urines de grossesse beaucoup plus concentrées en oestrogènes, on diluera au 1/10 une des solutions huileuses précédentes suivant l'âge de la grossesse - on pourra ainsi explorer selon les cas entre 1.000 et 20.000 U.I.

N° de la dilution	1	2	3	4
Volume d'huile en ml. dissolvant l'extrait de 100 ml. d'urine	5	20	on dilue au 1/10 la sol. 1	on dilue au 1/10 la sol. 2
Rapport de concentration : $\frac{\text{solution huileuse}}{\text{urine}}$	20	5	2	0,5
Vol. d'urine en ml. correspondant à la dose de sol. huileuse injectée à chaque souris.	6	1,5	0,6	0,15
Zone explorée en U.I. par litre d'urine	100 à 500	400 à 2.000	1.000 à 5.000	4.000 à 20.000

L'activité oestrogène de l'urine à essayer par rapport à l'oestrone, pourra se calculer d'après une formule simple :

soit :

"a" en gamma, la dose d'oestrone déduite du rapport utérin trouvé et contenue dans 0,3 ml. de solution huileuse injectée.

"v" en ml. le volume d'huile ayant dissout l'extrait.

et "D" en ml. la diurèse des 24 heures.

on aura, si l'on a traité 100 ml. d'urine :

$\frac{a \times v \times D}{0,3 \times 100}$ en gammas d'oestrone, et en multipliant par 10 en Unités internationales.

EXEMPLE : pour une diurèse de 1 litre par 24 heures, en adoptant la dilution 1 du tableau, avec un rapport utérin de 210, correspondant suivant le standard précédant à 0,15 gamma injectés

à chaque souris, la formule donne :

$$\frac{0,15 \times 5 \times 100}{0,3 \times 100} = 25 \text{ gammas d'oestrone ou } 250 \text{ U.I./24h.}$$

Il est prudent de répéter périodiquement l'étalonnage avec plusieurs doses d'oestrone.

Dans chaque série de dosages quelques animaux sont laissés non injectés pour contrôler la valeur du rapport utérin "à blanc".

Il faut aussi refaire un étalonnage avec quelques animaux en leur injectant cette fois une seule dose d'oestrone 0,10 gamma par exemple, le rapport utérin peut varier en effet avec celui donné par la même dose d'oestrone dans un étalonnage précédent; on modifiera donc, s'il y a lieu d'après le résultat obtenu les correspondances entre les rapports utérins et les différentes doses d'oestrone (voir note)

En opérant ainsi nous appliquons le même principe général que celui employé en chimie analytique que pour les dosages colorimètriques lus à l'électrophotomètre :

vérification d'un point de la courbe, la courbe étant elle-même refaite périodiquement.

VERIFICATION DE LA VALIDITE DE LA METHODE -

Nous avons effectué les essais suivants :

- A - Nous avons d'abord injecté à différents lots de souris des dilutions croissantes préparées à partir d'un même extrait urinaire : nous avons pu obtenir des réponses qui avaient entre elles le même rapport que celui des doses injectées :

1°- Dose : x 1

P (gr.) Poids du corps	7	6	7	6,5	8	7	7
U (mgr) Poids utérin	10	10	9	9	9	9	6

Rapport utérin : 125

correspondant à 0,06 gamma d'oestrone.

NOTE - Pour des doses de 0,09 gamma d'oestrone nous avons trouvé des rapports utérins variant de 160 à 190, ceci en opérant avec des animaux provenant d'élevages différents, au cours d'une période de 2 ans.

2°- Dose : x 2

P (gr) Poids du corps	7	8	8,5	7	7	7	11
U (mgr) Poids utérin	11	15	14	14	13	14	19

Rapport utérin: 185
correspondant à 0,12 gamma d'oestrone

3°- Dose : x 5

P (gr) Poids du corps	8,5	5	7	6,5	5	7	6	7
U (mgr) Poids utérin	21	15	20	22	18	21	18	22

Rapport utérin: 301
correspondant à 0,30 gamma d'oestrone

Autre expérience :

Dose : x 3

P (gr) Poids du corps	8	6	6	6	8	7	6	6
U (mgr) Poids utérin	8	9	8	10	10	12	10	9

Rapport utérin: 140
correspondant à 0,08 gamma d'oestrone

Dose: x 4,5

P (gr) Poids du corps	6	5	6	6	6	6	6	5
U (mgr) Poids utérin	13	13	12	11	10	13	11	11

Rapport utérin: 200
correspondant à 0,13 gamma d'oestrone

enfin,

Dose : x 1

P (gr) Poids du corps	7	6	6	6	9	7
U (mgr) Poids utérin	14	17	16	17	19	17

Rapport utérin: 230
correspondant à 0,15 gamma d'oestrone

Dose : x 2

P (gr) Poids du corps	9	6	9	7	6
U (mgr) Poids utérin	17	20	19	19	21

Rapport utérin: 316

correspondant à 0,30 gamma d'oestrone

Nous avons recherché d'autre part dans quelle proportion une quantité déterminée d'oestrone pure, ajoutée dans une urine pourrait se retrouver. A cet effet :

- dans un premier temps, nous avons dosé les oestrogènes dans une urine.

- puis, à un autre échantillon identique de cette urine, nous avons ajouté 3 gammas d'oestrone %, soit 33 U.I. par litre. L'extrait de ces urines enrichies a été divisé de façon à injecter deux séries d'animaux, respectivement avec une partie aliquote et avec la dose double.

Les résultats ont été les suivants :

	Urine normale	La même urine enrichie de 300 U.I. 0/00 en oestrone	
Volume d'extrait urinaire injecté	3 ml.	1 ml.	2 ml.
Rapport utérin moyen	179	144	195
Dose d'oestrone correspondante en gamma	0,11	0,07	0,13
Résultats trouvés en U.I. 0/00 d'oestrone	360	700	650
Résultats théoriques		660	660

On voit donc que l'oestrone ajouté se retrouve de façon satisfaisante.

SERIES DE DOSAGES PRATIQUES AU COURS DU CYCLE -

Nous avons étudié avec cette technique :

- l'élimination des oestrogènes dans les urines chez sept jeunes femmes ou jeunes filles cliniquement normales, en pratiquant pendant un cycle pour chacune d'elle, de 3 à 5 dosages - chaque échantillon analysés étant prélevé sur la totalité des urines de 48 heures, et les chiffres ont été rapportés au volume de 24 heures (voir tableau page 30).

- la date des maxima d'élimination hormonale, est située, pour 6 des cas étudiés, au cours de la 2ème partie du cycle; pour l'autre cas, le maxima se trouve au moment de l'ovulation. La valeur de ces maxima est très variable et se situe entre 220 et 460 U.I. / 24 heures.

- l'exploration est donc faite dans les meilleurs conditions lorsque l'on pratique plusieurs dosages par cycle,par exemple : 7ème, 14ème, 21ème et 26ème jour du cycle et sur les urines de 24 heures ou mieux, de 48 heures.

Les extraits se conservent bien à la glacière, on peut pratiquer simultanément les injections aux animaux.

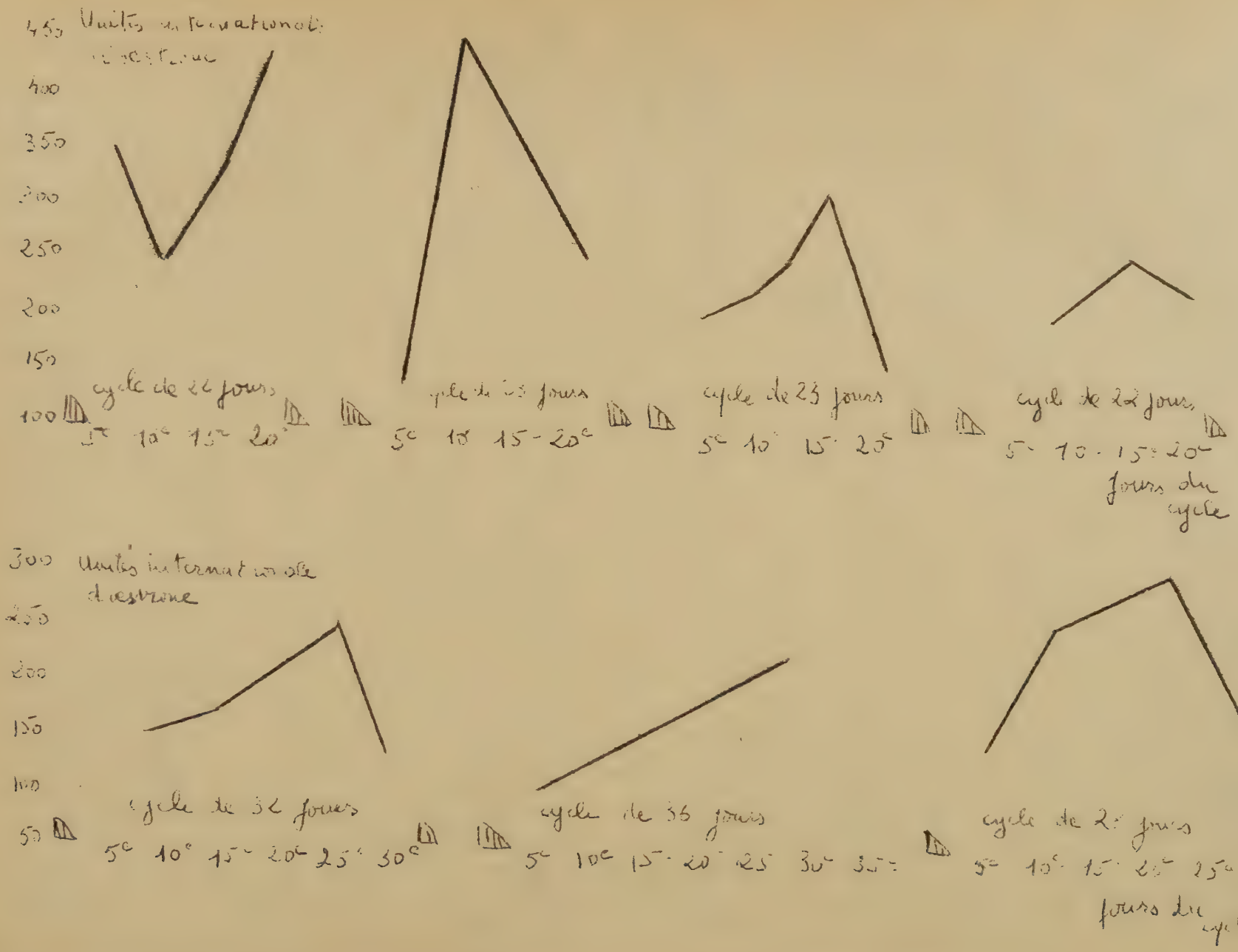
On a ainsi pour le cycle un diagramme d'élimination des oestrogènes.

L'exploration d'un cycle par une séris de frottis reste évidemment d'un emploi moins onéreux; elle ne nécéssite pas la discipline fatiguante de la récolte intégrale des urines, mais ne donne pas la même précision.

RESULTATS DE 91 DOSAGES D'OESTROGENES URINAIRES PRATIQUES CHEZ DES FEMMES NON ENCEINTES, REGLEES OU NON -

Nous avons dû nous contenter d'un seul dosage sur les urines de 24 heures. Pour les femmes règlées, les urines ont été prélevées le 21ème jour du cycle.

Les chiffres sont rapportés à la diurèse de 24 heures et exprimés en U.I. d'oestrone.


Unités internationales d'oestrone
450
400
350
300
250
200
150
100
cycle de 22 jours
5e 10e 15e 20e
cycle de 23 jours
5e 10e 15e 20e
cycle de 23 jours
5e 10e 15e 20e
cycle de 22 jours
5e 10e 15e 20e
jours du cycle
300
250
200
150
100
50
Unités internationales d'oestrone
cycle de 32 jours
5e 10e 15e 20e 25e 30e
cycle de 35 jours
5e 10e 15e 20e 25e 30e 35e
cycle de 2[illegible] jours
5e 10e 15e 20e 25e
jours du cycle

Valeur	- 50 à 200	200 à 500	500 à 900
Nombre de cas	18	66	7

HYPOOESTROGENIES -

Voici les renseignements cliniques que nous avons recueillis :

1°- Madame L., moins de 50 U.I., ménopausée.

2°- Madame B., moins de 50 U.I., ménopausée.

3°- Madame C., 90 U.I., ménopausée.

4°- Madame L., moins de 200 U.I., ménopausée.

5°- Madame C., 90 U.I.,:ménopause artificielle.

6°- Mademoiselle I., moins de 100 U.I., ménopausée.:

7°- Madame R., moins de 80 U.I., de plus le dosage des gonadotrophines a donné à 96 unités-souris, une réaction fortement positive ++++; malade ménopausée depuis 10 ans, avec obésité et dyspepsie biliaire.

Sur 7 cas de ménopauses on a obtenu dans deux cas une réponse faible à 90 U.I., les autres réponses ont été négatives.

8°- Mademoiselle G., (malade aimablement adressée à nous par Monsieur le Docteur BOUVIER): règlée au 23ème jour du cycle, on a trouvé 160 U.I.
autres résultats :
- 17 cétostéroïdes : 20 mgr. : alpha 18,5 mgr.
bêta 1,5 mgr.
- gonadotrophines : entre 6 et 48 Unités souris.
En même temps qu'un hirsutisme est apparu, les règles deviennent irrégulière et moins abondantes.

9°- Madame L., moins de 50 U.I., 25 ans, aménorrhée depuis 3 mois;
- gonadotrophines entre 6 et 12 unités souris.

10°- Madame M., moins de 100 U.I., aménorrhée.

11°- Mademoiselle L., (Monsieur le Docteur BECLERE) moins de 50 U.I. dans deux dosages à 20 jours d'intervalle; aménorrhée depuis 20 mois.
- règlée à 15 ans puis aménorrhées fréquentes.
- à 15 ans 1/2, épisode infectieux grave (hépatite ?), maigrit alors de 13 kgs.
- en Avril 1953 : taille 1,51 m; poids 33 kgs., système pileux normal, seins, vulve et utérus peu développés.
- température rectale matinale, toujours folliculinique.
- en Juin 1953, pèse 31 kgs 700, état squelettique, est adressée au Professeur DECOURT.

- autres examens :
  - 17 Cétostéroïdes : 7 mgr./ 24 Heures.
  - Gonadotrophines : réaction négative à 6 et 24 Unités souris.

12°- Mademoiselle L., 50 U.I., 13 ans

13°- Mademoiselle L., (Monsieur le Docteur BECLERE) - 26 ans, aménorrhée depuis 3 mois.
  - règle à 13 ans. Normale jusqu'à 17 ans.
  - après un gros choc psychique, les règles deviennent irrégulières, puis s'arrètent; ensuite les règles reviennent mais irrégulièrement.
- Examen : 1 m. 53, 60 kgs., seins normaux, système pileux normal, vulve et utérus normaux, utérus un peu au-dessous de la normale à l'hystérographie : 5 cms.
- autres résultats :
  - gonadotrophines comprises entre 24 et 48 unités souris.
- un traitement au Distilbène fait réapparaitre les règles.

Insuffisance oestrogènique avec troubles neuro-végétatifs.

14°- Madame X., 50 U.I.

15°- Mademoiselle J., 75 U.I., aménorrhée depuis un an.
  - gonadotrophines: réaction positive à 48 U.souris.

16°- Mademoiselle N., deux dosages à 70 et 80 U.I.
  - gonadotrophines: résultats compris entre 6 et 48 unités souris.
  - anorexie mentale.

17°- Mademoiselle P., moins de 50 U.I., aménorrhée primaire.
  - agénésie ovarienne probable.

18°- Mademoiselle M., 60 U.I., aménorrhée non ménopausique.

En déduisant le cas pour lequel nous n'avons pas eu de renseignements et celui de la personne trouvée au 14ème jour avec moins de 100 U.I., les 16 autres cas se classent ainsi :

Ménopauses naturelles.....	6
" " artificielles	1
Aménorrhées prépubertaires.....	1
" " primaires.....	1
" " secondaires	7

LES HYPERHORMONALES -

Voici les renseignements cliniques que nous avons recueillis :

- Madame P., 900 U.I.
- Madame D., 600 U.I.
- Madame P., 550 U.I.
- Madame G., (Consultation de Gynécologie - Docteur BECLERE) plus de 500 U.I.
  - Hystérectomie sub-totale pour fibrome - un ovaire restant.
  - Obésité hyperhormonale.
- Madame S., (Consultation de Gynécologie - Docteur BECLERE)
  - règlée au 21ème jour - 620 U.I.
  - hémoptysies fonctionnelles - examen pulmonaire négatif.
  - frottis (Docteur GUEGAN): hyperoestrogènie relative.

Mademoiselle T., 20 ans et demi (Docteur BECLERE), plus de 600 U.I.
- depuis l'âge de 12 ans diabète grave (à la découverte, glycémie à 4,45 gr. - glycosurie: 165 grs./24 h.) traitée à l'Insuline.
- règlée à 16 ans; alors arrêt de croissance; malaise avec aggravation du diabète au moment des règles.
- avec un traitement: corps jaune + testostérone, on peut faire baisser la dose d'Insuline nécéssaire pour équilibrer la malade.
- épisode de bacillose : traitement chimiothérapique.

- Examen : malade règlée tous les 28 jours, durée 7 jours, règles non douloureuses.
taille : 1,52 m., poids : 56 kgs., température rectale matinale toujours folliculinique.

L'hyperostrogènie explique les bons résultats avec le traitement par hormone mâle et corps jaune.

(Monsieur le Professeur LEMAIRE nous a aimablement communiqué les renseignements cliniques).

- Madame B., 600 et 800 U.I. à 10 jours d'intervalle.
  - aménorrhée depuis 3 mois.
  - gonadotrophines: dose comprise entre 48 et 96 Unités souris, Réaction de Friedman négative

Hyperoestrogènie clinique se manifestant par des douleurs dans les seins avant les règles, une diminution progressive des règles abondantes à une aménorrhée totale qui a duré un an environ; les dosages ont été faits pendant cette période; depuis les règles sont réapparues.

NOTE - Nous remerçions Monsieur le Docteur GUEGAN qui nous a aimablement communiqué les résultats des frottis de Madame S.,

QUELQUES DOSAGES PRATIQUES DANS LES URINES D'HOMME -

En prenant comme normal, selon RAKOFF, un taux d'élimination situé autour de 125U.I./24h.; nous avons sur 22 dosages obtenus 6 résultats augmentés.

Dans trois cas nous avons pu avoir les renseignements suivants :

1°- Monsieur D., deux dosages : 190 et 110 U.I. : insuffisance hépatique.

2°- Monsieur M., gynécomastie (ce malade nous a été aimablement adressé par Monsieur le Professeur TURIAF). Malade suivi pendant 2 ans.

9.10.52 : plus de 280 U.I.
26.10.52: 250 U.I.
22.1.53 : plus de 250 U.I.
20.10.53: 260 U.I.
24.5.54 : 140 U.I.

lors de son dernier dosage l'aspect clinique était redevenu sensiblement normal, il avait été traité par le testostérone à fortes doses.

3°- Monsieur B., 280 U.I.
- tumeur du testicule (à cellules de Leydig).

Un dosage pratiqué dans un liquide de KYSTE OVARIEN a donné 5.350 U.I. par litre.

Dans un liquide de PONCTION ANNEXIELLE on a trouvé 2.800 U.I. par litre.

Nous avons enfin effectué quelques dosages dans les urines de femmes enceintes pour pouvoir comparer les taux sanguins et urinaires.

Les résultats s'échelonnent entre 800 U.I./ 24h. pour les premières semaines et 12.000 U.I. pour les dernières semaines.

Citons les cas de :

- 1°- Madame V., enceinte de 3 mois et demi.
  - taux d'oestrogènes urinaires : moins de 1.300 U.I. par 24 h.
  - taux de pregnandiol (technique BETHOUX) : 5 mgr./24 h.

  Cette femme avorta 5 jours après la récolte des urines.

- 2°- Madame B., enceinte d'un mois et demi.
  - diagnostic biologique positif (réaction de FRIEDMAN et BROUHA : plus de 100 u./00)
  - oestrogènes urinaires : moins de 500 U.I./24 h.
  - pregnandiol : 10 mgr.

  Avortement 8 jours après la récolte des urines.

DOSAGES DANS LE SERUM -

Il a paru interessant de chercher à doser les oestrogènes dans le sérum : on peut ainsi éviter l'inactivation possible au niveau du rein ainsi que les variations de l'élimination urinaire survenant dans les néphrites authentiques aussi bien que dans les banales rétentions d'eau.

Nous avons cherché à obtenir une méthode d'extraction simple, utilisable dans la pratique courante :

- Principe -

- On chauffe le sérum au bain-marie bouillant en milieu chlorhydrique ; ainsi on réalise à la fois l'élimination des gonadotrophines et une hydrolyse d'ailleurs partielle.

- On fait une extraction à l'éther des lipides collés au précipité protéique, les oestrogènes passent dans l'éther avec les lipides.

- Mode opératoire -

- Le sérum (10 ml. au moins) est soumis à l'hydrolyse avec 30 % d'acide chlorhydrique au 1/2 dans des tubes à centrifuger cylindriques (de préférence en matière plastique) que l'on plonge dans un bain-marie bouillant pendant une 1/2 heure. Au début du chauffage il se produit un dégagement de gaz

NOTE - Ce liquide a été essayé, après neutralisation, par injection à la souris ; il ne contient qu'une faible proportion d'oestrogènes, le 1/10 environ par rapport aux lipides du culot.

formant de la mousse par destruction des bicarbonates, puis le mélange se liquéfie, brunit et se concentre; on centrifuge ensuite et on rejette la petite portion de liquide aqueux fortement acide qui surnage le culot de précipitation.

- Ce culot protéique est extrait par agitation énergique avec 4 fois 20 cm3 d'éther en présence de billes de verre, après avoir soigneusement bouché le tube. Nous agitons à la main ou mieux à l'agitateur de Kahn. Nous centrifugeons le culot après avoir décanté chaque fraction d'éther. (voir note)

- La solution éthérée toujours limpide est colorée en jaune clair par les lipides qu'elle contient; nous la plaçons dans un petit ballon qui est adapter à un appareil à distiller; puis nous chassons l'éther par chauffage au bain-marie à 50°.

- le résidu lipidique est repris par une quantité d'huile variable selon la dose présumée. Il ne reste plus qu'à l'injecter à l'animal.

- L'activité oestrogène du sérum à essayer par rapport à l'oestrone est calculée selon la formule suivante :

soit "a" en gamma la quantité d'oestrone déduite du rapport utérin, contenue dans 0,3 ml. de solution huileuse injectée.

"v" en ml. le volume d'huile ayant dissout l'extrait

et "V" le volume de sérum mis en oeuvre :

$$\frac{a \times v \times 1.000}{0,3 \times V}$$ en gamma 0/00, en multipliant par 10 en unités internationales 0/00.

Si, par exemple, on obtient une réponse minima à 0,6 gamma, avec 30 ml. de sérum l'extrait étant repris par 2 ml. d'huile, la formule donnera :

$$\frac{0,06 \times 2 \times 1.000}{0,3 \times 30} = 13 \text{ gammas ou } 130 \text{ U.I. } 0/00$$

En pratique, il sera difficile de rechercher dans le sérum des doses plus faibles.

Les travaux de FRANK indiquent que 40 ml. de sang total correspondent, chez une femme règlée, au 21ème jour du cycle, à environ 1 unité souris ou 1 U.I. d'oestrogènes libres, soit 25 U.I. d'oestrogènes libres par litre.

NOTE - Il est curieux de constater que l'on n'obtiendra pas de meilleurs extractions en plaçant le culot protéique homogénéisé avec du sable dans l'allonge d'un appareil de KUMAGAWA avec extraction à l'éther.

Le test de FLUHMANN permet d'explorer dans le sérum de 30 à 250 U.Souris par litre d'oestrogènes.

Le test proposé est donc moins sensible et il n'a pas été possible de déceler un pouvoir oestrogènique dans le sérum des femmes règlées.

Pour les sérums des femmes enceintes nous avons obtenu des réponses moyennes allant de 550 U.I. 0/00 pendant les premières semaines à 4.300 U.I. 0/00 pour les dernières semaines. (Voir tableau et courbes).

Les SMITH, rappelons-le, trouvent en 1937-1938 au 3ème mois 100 unités rates, au 9ème mois 1.000 unités rates.

RAKOFF en 1939, entre la 4ème et la 40ème semaine trouve une montée régulière de 500 à 5.000 unités souris 0/00.

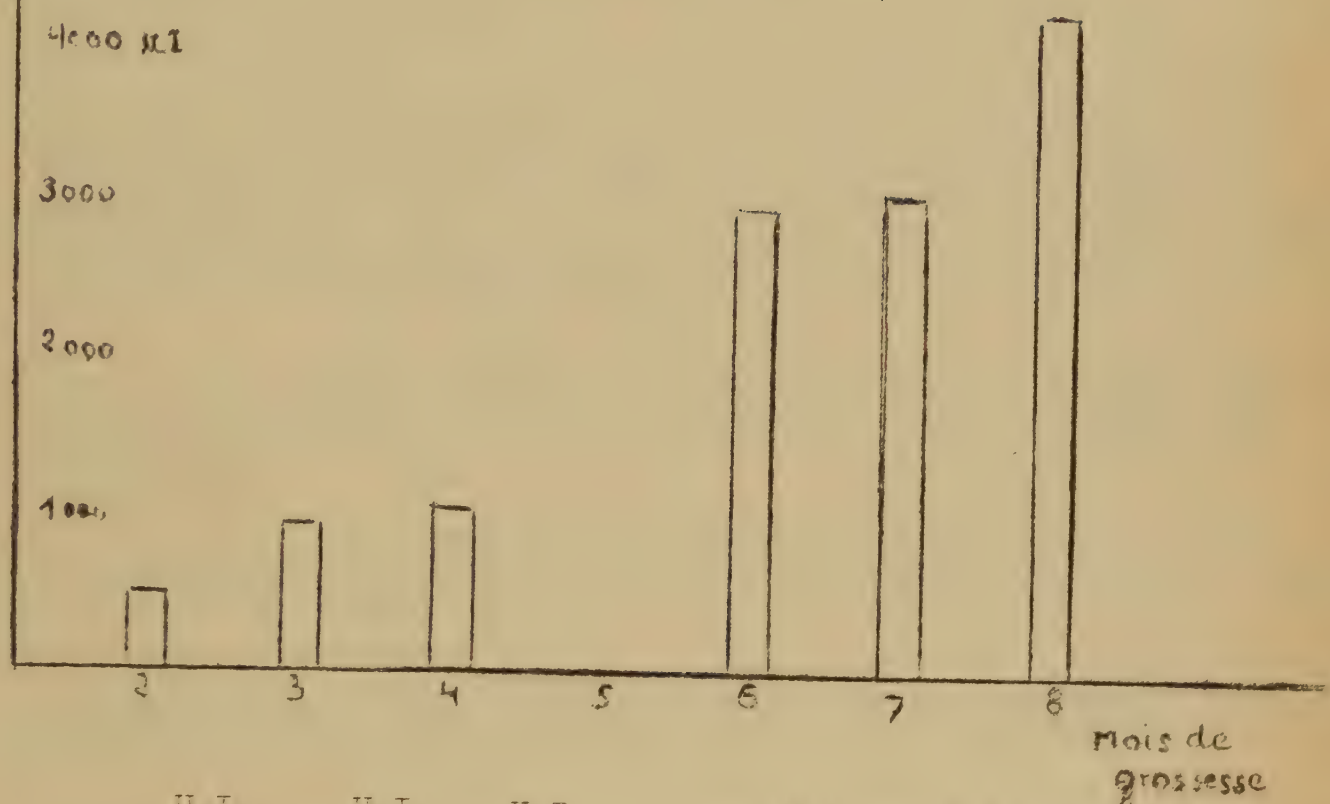
ZONDEK en 1947 :

de 1 à 2 mois trouve 100 à 200 U.I. d'oestrone 0/00
de 3 à 7 mois trouve 200 à 1.600 U.I. d'oestrone 0/00
de 7 à 9 mois trouve 1.600 à 3.000 U.I. d'oestrone 0/00

Nos chiffres sont donc voisins de ceux obtenus avec le test classique d'Allen et DOISY, en utilisant le sérum non hydrolysé.

SZEGO (1947) en libèrant les oestrogènes liés aux protéines obtient de 1.200 à 7.300 U.I. d'oestrone 0/00, mais l'extraction est très longue et très délicate.

Il semble donc que l'extraction employée permette d'injecter les oestrogènes libres sans libérer les liaisons oestrogènes-protéines.



U.I.	U.I.	U.I.		U.I.	U.I.	U.I.		
40 "	800 "	580 "		2.900 "	2.900 "	5.300 "		
140 "	300 "	370 "		3.300 "	2.500 "	5.600 "		
700 "	900 "	1.100 "			1.600 "	2.400 "		
850 "	1.250 "	2.200 "			4.600 "	3.900 "		
650 "	960 "				5.200 "			
550 "	1.200 "				2.100 "			
					3.400 "			
550 "	900 "	1.050 "		3.100 "	3.200 "	4.300 "		

- C O N C L U S I O N -

1°- D'après nos recherches, la méthode de dosage biologique des oestrogènes basée sur l'augmentation pondérale de l'utérus du rongeur impubère, beaucoup plus simple que la méthode classique, est pratique, économique et nous a dans l'ensemble donné de bons résultats aussi bien lors des contrôles que par la concordance avec les faits cliniques.

2°- L'extraction dans les urines et le sérum pour obtenir la solution injectable est simple; il est en effet inutile de purifier avec autant de soins que lors des dosages chimiques.

3°- L'étalonnage des animaux peut se refaire facilement puisqu'il suffit de peser l'utérus d'animaux injectés avec une solution titrée.

4°- La lecture des résultats qui consiste à peser un organe à la balance de torsion est un geste objectif où n'entre pas de facteur personnel d'appréciation.

5°- On distingue différentes zones de recherches que l'on peut explorer (de 50 à 250 unités ou de 100 à 500 par exemple) le plus souvent un seul essai avec 5 ou 6 souris est suffisant pour obtenir un résultat dans la zone choisie.

6°- Plusieurs dosages ont été effectués au cours du cycle menstruel de sept femmes normales - La date du maximum d'élimination est fixé pour six d'entre elles au milieu de la deuxième partie du cycle; la valeur de ces maxima varie entre 220 et 460 unités internationales par 24 heures.

7°- Parmi 90 dosages pratiqués chez des femmes non enceintes, règlées ou non, consultantes en gynécologie, nous avons obtenu :

- pour 16 cas des chiffres bas :
  de moins de 50 à 200 Unités Internationales.
- pour 66 cas des chiffres normaux :
  de 200 à 500 Unités Internationales.

- pour 7 cas des chiffres élevés :

de 500 à 900 Unités Internationales.
la confrontation entre les faits cliniques et les résultats est satisfaisante.

8°- Les dosages dans le sérum de femmes non enceintes ne peuvent offrir l'intérêt avec cette méthode que dans les cas d'hyperoestrogènie très importante : il est en effet impossible de mettre en évidence les doses minimes (de l'ordre de 50 unités par litre) présentées dans le sang pendant la période favorable.

9°- Dans les urines de femmes enceintes nous avons trouvé de 800 à 12.000 U.I./24 h. selon l'âge de la grossesse.

10°- La technique d'extraction que nous avons mise au point permet des dosages commodes dans le sérum des femmes enceintes où nous avons trouvé de 550 à 4.300 U.I. par litre suivant l'âge de la grossesse.
Des dosages comparatifs dans le sang et l'urine semblent intéressants à effectuer dans l'étude de certaines grossesses pathologiques, en particulier les toxicoses gravidiques.

11°- En conclusion, nous pensons que la méthode utilisée est simple, fidèle et qu'elle donne des résultats satisfaisants tant au point de vue du diagnostic étiologique des troubles hormonaux que de leurs indications thérapeutiques.

Vu, le Doyen :
signé: L BINET

Vu, le Président
de Thèse :
signé: J. QUENU

Vu et Permis d'imprimer,
le Recteur de l'Académie de Paris
Le Vice-Président du Conseil
de l'Université de Paris :

signé: illisible

B I B L I O G R A P H I E

1 - STOCKARD C.R. & PAPANICOLAOU G.N.-
Am. J. anat. XXII, 225, 1917

2 - ASCHHEIM P. -
Bruxelles médical, 48, 2355, 1954

3 - LONG & EVANS -
Memors of Univ. of Calif., v.6, 1922

4 - ALLEN E. -
Am. J. anat. 30, 297, 1922

5 - COURRIER R.-
C - R. Ass. anat. (réunion de Lyon) p.145, 1923

6 - ALLEN E., E.A. DOISY -
J.A.M.A. 81, 819, 1923

7 - ALLEN E., E.A. DOISY -
Am. J. anat. 34, 133, 1924

8 - E.A DOISY, J.O. RALLS, ALLEN E., C.G. JONHSTON -
J. of Biol. chem. 61, 711, 1924

9 - R.T. FRANK & R.G. GUSTAVSON -
J.A.M.A. 84, 1715, 1925

10- R.T. FRANK, M.L. FRANK, GUSTAVSON R.G., WEYERTS W.W. -
J.A.M.A. 85, 910, 1925

11- S. LOEWE -
Klin. Wochensch. 4, 1407, 1925

12- R. FRANK et coll. -
J.A.M.A. 86, 1680; 1926

13- R. FRANK et coll. -
J.A.M.A. 87, 354, 1926

14- R. FRANK et coll. -
J.A.M.A. 87, 1719, 1926

15- R. FRANK et coll. -
J.A.M.A. 90, 106, 1928

16- R. FRANK et coll. -
J.A.M.A. 90,376, 1928

17- R. FRANK et coll. -
J.A.M.A. 97, 1853, 1931

18- R. FRANK et coll. -
J.A.M.A. 101, 266, 1933

19- R. FRANK et coll. -
J.A.M.A. 115, 1504; 1940

20- M.G. SMITH -
The John Hopkin's Hospital Bulletin, 41, 62, 1927

21- L.C. KAHNT, E.A. DOISY -
Endocrinology, 12, 760, 1928

22- ASCHHEIM, ZONDEK B. -
Klin Wochensch. 7, 1404, 1928

23- ASCHHEIM, ZONDEK B. -
Klin Wochensch. 6, 1322, 1927

24- E.A. DOISY, VELER C.D., THAYER S.A. -
Am. J. Physiol. 90, 329, 1929

24bis- E.A. DOISY, VELER C.D., THAYER S.A. -
J. Biol. Chem. 86, 499, 1930

25- BUTENANDT -
Naturwissensch. 17, 878, 1929

26- A. DURUPT -
Gynec. et obst. 37, 183, 1928

27- HAM A.M. & J.M. ROBSON -
J. Pharmacol. & Exper. Therap. 57,337,1936

28- ZONDEK B. & F. SULMAN -
Endocrinology, 49, 417, 1951

29- E.A. DOISY -
Science, 77, 344, 1933

30- Mac CORQUODALE,D.W., THAYER S.A., DOISY E.A. -
J. Biol. Chem. 115, 436, 1936

31- G.W. SMITH, O.W. SMITH -
Am. J. Physiol. 112, 340, 1935

32- R.G. GUSTAVSON, D.F. GREEN -
J. Biol. Chem. 105, XXXIV, 1934

33- R.G. GUSTAVSON, E.E. HAYS, T.R. WOOD -
J. Biol. Chem. 119, XLII, 1937

34- R.G. GUSTAVSON, L.W. MASON, E.E. HAYS, T.R. WOOD, F.E. d'AMOUR
Am. J. Obst. and Gynec. 35, 115, 1938

35- G.W. SMITH, O.W. SMITH, G. PINCUS -
Am. J. Physiol. 121, 98, 1938

36- HAM A.M. -
Edimburgh Med. J. 45, 678, 1938

37- DINGEMANSE E. & E.LAQUEUR -
Nederland Tijdsch. v. geneesk. 84, 3287, 1940

38- G.W. SMITH & O.W. SMITH -
Am. J. Obst. and Gynec. 33, 365, 1937

39- G.W. SMITH & O.W. SMITH -
Am. J. Obst. and Gynec. 36, 769, 1938

40- O.W. SMITH & G.W. SMITH -
Endocrino, 28, 740, 1941

41- FLUHMANN C.F. -
Endocrinology. 18, 705, 1934

42- FLUHMANN C.F. -
Am. J. Obst. and Gynec. 32, 612, 1936

43- FLUHMANN C.F. & K.M. MURPHY-
Am. J. Obst. and Gynec. 38, 778, 1939

45- SOULE S.O. -
Am. J. Obst. and Gynec. 35, 309, 1938

46- A.E. RAKOFF - Am. J. Obst. and Gynec. 38, 371, 1939

47- A.E. RAKOFF, K.E. PASCKIS, A. CANTAROW -
Am. J. Obst. and Gynec. 46, 859, 1943

48- ASTWOOD E.B. -
Endocrinology, 23, 25, 1938

49- H.O. LAUSON, C.G. HELLER, J.B. GOLDEN & E.L. SEVERINGHAUS -
Endocrino, 24, 35, 1939

50- EVANS J.S., VARNEY R.F. & KOCH F.C. -
Endocrino, 28, 747, 1941

51- RUBIN B.L., DORFMAN A.S., BLACK L. & DORFMAN R.I. -
Endocrino 49, 429, 1941

52- REYNOLDS S.R.M. -
Am. J. Obst. and Gynec. 36, 437, 1938

53- O. HECHTER, M. LEV & S. SOSKIN -
Endocrino, 26, 73, 1940

54- O. HECHTER, L. KROHN & J. HARRIS -
Endocrino, 29, 386, 1941

55- D.F COLE -
J. of Endocrino, 7, 12, 1950

56- BORY -
Gynécologie et Obstétrique 51, 450, 1952

57- H.H.POWERS, J.R. VARLEY & J.A. MORELL -
Endocrino, 13, 395, 1929

58- W.R. LYONS, H. TEMPLETON -
Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 33, 587, 1936

59- L.D. YERBI -
Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 36, 496, 1937

60- A.S. ALBRIEUX -
Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 47, 380-381, 1941

61- A.S. ALBRIEUX -
J. Clin. Endocrino. 1, 889, 1941

62- C.W. EMMENS -
J. of Endocrino. 2, 444, 1941

63- C.G. HARTMAN, J.L. LITTREL & J. TOM -
Endocrino, 39, 120, 1946
Endocrino, 40, 292, 1947

64- C.W. LOYD, F. ROGERS & H. WILLIAMS -
Endocrino, 39, 256, 1946

65- J.D. BIGGERS -
J. of Endocrino. 7, 163, 1950-1951

66- F.G. SULMAN -
Endocrino, 50, 61, 1952

67- Ch. MAYER -
Gynécologie et Obstétrique, 4, 857, 1952

68- TALBOT -
Endocrino, 25, 601, 1939

69- C.G. HELLER -
Endocrino, 26, 619, 1940

70- DINGEMANSE E. -
Endocrino, 28, 450, 1941

71- SCHILLER & PINCUS -
Endocrino, 34, 203, 1944

72- C.M. SZEGO & S. ROBERTS -
Endocrino, 36, 104, 1945

73- C.M. SZEGO & S. ROBERTS -
Endocrino, 40, 73, 1947

74- C.M. SZEGO & S. ROBERTS -
Endocrino. 41, 322, 1947

75- C.M. SZEGO & S. ROBERTS -
Endocrino. 39, 183, 1946

76- C.M. SZEGO & S. ROBERTS -
Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 61, 161, 1946

77- B. ZONDEK & R. BLACK -
J. Clin. Endocrino, 7, 519, 1947

78- J. RUPP, A. CANTAROW, A.E. RAKOFF, K.E. PASCHKIS -
J. Clin. Endocrino. 11, 688, 1951

79- C.M. SZEGO -
Endocrino, 52, 669, 1953

80- F.D. HUMN, L. MANSON & W.I. SALTER -
Endocrino, 48, 225, 1951

81- PALMER A. -
Am. J. Obst. & Gynec. 37, 492, 1939

82- E. OSTERGAARD -
J. clin. Endocrino. 7, 438, 1947

83- B. BONDONNY, P. A. CASTETS, G. DEMANGE & P. BALLAN -
J. de Med. de Bordeaux et du Sud-Est, 7, 704, 1951

84- A. NETTER & R. HENRY -
Annales d'Endocrinologie, 11, 630, 1950

85- L. RIXE -
Thèse de Médecine, Paris, 1952

86- H. SIMONNET & Cl. BECLERE -
La Parthénologie exp. scient. française ,
fasc. II, page 217, 1939

87- Cl. BECLERE & H. SIMONNET -
Soc. Gynec. & Obst. - Juillet 1941

88- H. SIMONNET & Cl. BECLERE -
Annales d'Endocrinologie - t3, n°3, p.164, 1942

89- H. SIMONNET & Cl. BECLERE -
Questions gynécologiques d'actualité.
l'Expansion scientifique française, t3, n°1, p.45,1943

90- H. SIMONNET & Cl. BECLERE -
Revue Française de Gynécologie, t. 38, n°6, p.183,1943

91- Cl. BECLERE -
Les Feuillets du Praticien, n&45, Décembre 1941

92- Cl. BECLERE -
Paris Médical, T. 32, n°51, 1942

93- Cl. BECLERE -
Diagnostic hormonal et traitement hormonaux en
Gynécologie - Masson ed. 1949

94- SAINTON P., SIMONNET H. & BROUHAL -
Endocrinologie clinique, thérapeutique et expérimentale - 1 vol. Masson et soc. 1937

95- M.F. JAYLE -
Bull. Soc. Chimie biol. 32, 1067-71, 1950

96- COURRIER R. -
Endocrinologie de la gestation , 1951

97- M.F. JAYLE & O. CREPY -
Colloque sur la fonction lutéale, p 1-26, 1954
Les stéroïdes urinaires.

98- MF. JAYLE, PLANTUREUX G. -
Bull. Fed. Soc. Gynec. Obst. de langue française
t.5, n°5, p 551, 1953